English

Quantimal™ pLDH Malaria CELISA

INTENDED USE

Malaria can be diagnosed by many methods. It is well established that the presence of pLDH in clinical blood samples is indicative of active infection and its absence reflects the cure or the lack of malaria infection. Unlike histidine rich proteins like HRP-2, the pLDH enzyme is secreted only by live parasites and survives only briefly in the patient blood. The Quantimal™ pLDH Malaria CELISA test can therefore be used to detect current and active infection as well as assist in monitoring anti-malarial chemotherapy.

The Quantimal™ pLDH CELISA kit detects the enzyme lactic dehydrogenase (pLDH) common to all *Plasmodium spp*. This is a confirmatory test for active and current human malaria. Quantimal™ pLDH Malaria CELISA can also be used to monitor anti-malarial chemotherapy, to monitor resistance of *Plasmodium* parasites to chemotherapy and for in-vitro evaluation of anti-malarial drugs. It is not intended to replace the conventional blood film diagnosis. The sandwich ELISA principle is employed.

Quantimal™ pLDH Malaria CELISA can be used with a variety of clinical samples such as whole blood, patient blood culture (drug resistance studies), plasma or serum.

CONTENTS OF THE KIT

		Standard	Bulk pack
MPMW	Celisa plate ï 2 x 96 wells (single use)	2 plate	10 plates
CONTROL +	Positive Control	1 x 0.5 mL	1 x 1.0 mL
CONTROL -	Negative Control	1 x 2.5 mL	1 x 5.0 mL
MPPO	Enzyme Conjugate (200x)	1 x 0.12 mL	1 x 0.7 mL
MPCD	Conjugate Diluent	1 x 24 mL	1 x 120 mL
MPPT	PBS/Tween (20x)	1 x 125 mL	1 x 500 mL
MPSC	Substrate Chromogen (TMB) (20x)	1 x 1.2 mL	1 x 7.0 mL
MPSB	Substrate Buffer	1 x 24 mL	1 x 125 mL
MPSS	Stopping Solution	1 x 12 mL	2 x 30 mL

Store at 2-8ºC. Expiry dates are clearly marked on each kit component and on the box. Expiry dates do not change once opened.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Distilled water, micropipettes and tips, clean glassware or plastic containers for solutions, humid chamber, ELISA washer, ELISA plate reader to read absorbances at a single wavelength of 450nm or at dual wavelength of 450nm and 620nm

PRECAUTIONS

For in-vitro diagnostic use only. Do not use after the expiry date shown on the label. If protective packaging is damaged, contact your local distributor and ask for a replacement. Do not mix reagents from different kits. Thimerosal preservative added to some components is a poison. Exercise caution when handling these components. The stopping solution is corrosive. Avoid contact with skin, eye and mucous membranes. Dispense all reagents with care to avoid cross contamination of wells. Avoid exposure of the substrate to light. Treat all clinical and control material as though potentially infectious and dispose of in accordance with local operating regulations. For further information, please refer to Material Safety Data Sheet.

INSTRUCTIONS FOR USE

Preparation of Wash Buffer

If crystals are present, pre-warm the concentrate to dissolve and stir on a magnetic stirrer until all crystals are dissolved. For each microplate, add 50mL PBS-Tween concentrate MPPT to 950mL of distilled water. Label the bottle WASH BUFFER and store at 2-8ºC. This buffer is used for diluting test samples, diluting the conjugate concentrate MPPO and washing the microplates.

Preparation of samples

Collect patient blood by standard venipuncture procedure using an anticoagulant. Blood specimens should be stored below -10ºC if the analysis is delayed. Fresh, refrigerated or frozen samples of serum, plasma or blood may be used. Avoid contamination by collecting aseptically. The CONTROL + is culture supernatant and the CONTROL - is RPMI. Prepare the CONTROL + by diluting 1 in 2 with the CONTROL - . Blood, plasma or serum samples are to be prepared by diluted using 1x WASH BUFFER ensuring proper mixing.

Assay Procedure

1. Bring all reagents to room temperature (18-25 ºC) before use.
2. Prepare WASH BUFFER (see Preparation of Wash Buffer)
3. Remove required number of MPMW strips. Reseal the foil bag containing unused microwell strips immediately with tape.
4. Pipette 100µL of the SAMPLE, positive control (CONTROL + or known positive) and negative control CONTROL - into individual microwells. Include two positive and two negatives in each assay run. Cover and incubate for one (1) hour at 37ºC in a humid chamber.
5. In the last 10 minutes of the incubation period, prepare the working strength CONJUGATE. Add 5µL of conjugate concentrate MPPO to 995µL of conjugate diluent MPCD and mix thoroughly (allow 1mL per strip of 8 wells).
6. Wash the wells preferably using an automatic plate/strip washer or manually as follows:
   - Empty contents from the wells. Refill with the WASH BUFFER.
   - Repeat this process a further four (4) times. After the fifth wash, bang inverted wells dry on absorbent tissue.
   - NB: take care when flicking out plates, hold side of frame firmLy to hold strips in place.
7. Add 100µL of diluted CONJUGATE to each well. Incubate for one (1) hour at in a humid 37ºC chamber.
8. In the last 10 minutes of the incubation period, prepare the working strength SUBSTRATE. Add 50µL of substrate chromogen MPSC to 950µL of substrate buffer MPSB and mix thoroughly (allow 1mL per strip of 8 wells). The stability of the solution is 30 minutes.
9. Repeat washing as in step 6.
10. Add 100µL of fresh SUBSTRATE and incubate in the dark (covered) at room temperature for 15 minutes.
11. Add 50µL of Stopping Solution MPSS. Tap the plate to mix.
12. Read the results visually or in a spectrophotometer at 450nm, or 450nm/620nm, blanking the machine on air.

READING AND INTERPRETATION OF RESULTS AND DIAGNOSIS

Visually

Observe the colour intensity of the control and specimen wells. The Positive Control should be blue before and yellow after stopping.

Photometrically

Read the microwell plate at 450nm or 450/620 in a compatible ELISA plate reader, blanked against air. For the test results to be accepted the controls must read as follows:

	O.D. Value (450nm or 450/620nm)
Negative Control	O.D. < 0.2
Positive Control	O.D. > 1.5

The cut off value (COV) can be determined by testing a number of known negative samples. The COV = mean OD plus 3 standard deviations.
All specimens with an absorbance value (O.D.) above the COV should be considered positive for *pLDH*. A positive result indicates the presence of pLDH from *Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax, Plasmodium ovale, Plasmodium malariae* or *Plasmodium knowlesi*. This is suggestive of a current infection. NOTE: The Quantimal™ pLDH Malaria CELISA kit does not distinguish between different species of *Plasmodium* infections. To detect specific infection caused by *Plasmodium falciparum,* contact Cellabs Pty Ltd for information on the Malaria Antigen (HRP-2) CELISA.

WASTE DISPOSAL
Dispose of any unused component as bio-hazardous waste. For more information, please refer to the MSDS.

INDEMNITY NOTICE
Modifications or changes made in the recommended procedure may affect the stated or implied claims and performance of the kit. Cellabs and its agents or distributors are not liable for damages under these circumstances.

Francais

Quantimal™ pLDH Malaria CELISA

PRINCIPE DU TEST ET INDICATIONS D'EMPLOI

Le paludisme peut être diagnostiqué de diverses façons. Il est établi que la présence de pLDH dans les échantillons sanguins cliniques reflète une infection paludéenne active et son absence reflète l'absence ou la guérison de l'infection. A l'inverse des protéines riches en histidine comme l'HRP-2, l'enzyme pLDH est secrétée uniquement par le parasite paludéen vivant et sa demi-vie sanguine est brève. La trousse Quantimal™ pLDH peut par conséquent être utilisé pour diagnostiquer une infection paludéenne active ainsi que dans le suivi thérapeutique anti-paludéen.

La trousse Quantimal™ pLDH CELISA détecte l'enzyme de déshydrogénase lactique (pLDH) commun à tous les *Plasmodium spp*. C'est un test de confirmation d'une infection paludéenne chez l'homme. La trousse Quantimal™ pLDH CELISA peut aussi être utilisée pour suivre la chimiothérapie anti-paludéenne, pour mesurer la résistance des parasites *Plasmodium* aux anti-paludéens et pour l'évaluation *in vitro* de nouveaux médicaments anti-paludéens. Ce test n'est pas conçu pour replacer le test diagnostic conventionnel de malaria à la goutte épaisse. Le principe utilisé est la méthode ELISA en sandwich.

La trousse Quantimal™ pLDH CELISA peut être utilisée avec divers types d'échantillons tels que le sang total sous anti-coagulant, les cultures de sang de patients infectés (études de chimiosensibilité), le plasma ou le sérum de patients, ainsi qu'avec le surnageant de cultures paludéennes de laboratoire. Les échantillons de plasma peuvent être utilisés directement.

COMPOSITION DU COFFRET

		Standard	Recherche
MPMW	Plaque CELISA ï 1 x 96 puits (usage unique)	2 plaque	10 plaques
CONTROL +	Contrôle Positif	1 x 0.5 ml	1 x 1.0 ml
CONTROL -	Contrôle Négatif	1 x 2.5 ml	1 x 5.0 ml
MPPO	Conjugue enzymatique (200x)	1 x 0.12 ml	1 x 0.7 ml
MPCD	Diluant pour conjugué	1 x 24 ml	1 x 120 ml
MPPT	PBS/Tween (20x)	1 x 125 ml	1 x 500 ml
MPSC	Substrat Chromogène (TMB) (20x)	1 x 1.2 ml	1 x 7.0 ml
MPSB	Tampon de substrat	1 x 24 ml	1 x 125 ml
MPSS	Solution d'arrêt	1 x 12 ml	2 x 30 ml

MATERIELS REQUIS NON FOURNIS

Eau distillée, micropipettes et embouts, verrerie propre ou récipients plastiques pour solutions, chambre humide, laveur ELISA ou bouteille de rinçage, lecteur de plaques ELISA capable de lire à 450nm or 450/620nm.

PRECAUTIONS

Produit à usage uniquement *in vitro*. Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Si l'emballage est abîmé, contactez votre fournisseur local pour un remplacement. Ne pas mélanger les réactifs de coffrets différents. Certains réactifs contiennent du Thimerosal comme préservatif, qui est un poison. Manipulez ces réactifs avec soin. La solution d'arrêt est corrosive. Evitez tout contact avec la peau, les yeux ou les membranes muqueuses. Ajoutez les réactifs en évitant tout risque de contamination croisée des puits. Evitez d'exposer le substrat chromogène à la lumière. Les échantillons cliniques et les contrôles doivent être considérés comme potentiellement infectieux et jetés selon les procédures adéquates. Consultez la fiche de sécurité du produit (notice MSDS) pour plus amples informations.

INSTRUCTIONS D'EMPLOI

Préparation du tampon de lavage
Si des cristaux apparaissent, réchauffer le réactif pour les dissoudre sur un agitateur magnétique jusqu'à leur disparition totale. Pour chaque plaque de micropuits, ajouter 50ml de concentré PBS/Tween MPPT à 950ml d'eau distillée. Libeller la bouteille WASH BUFFER et conserver à 2-8°C. Ce tampon est utilisé pour diluer les échantillons d'essai, concentré de conjugué MPPO et laver les plaques.

Préparation des échantillons de sang

Collecter l'échantillon patient par ponction veineuse normale sous anticoagulant. Congeler les échantillons sanguins en dessous de -10°C si l'analyse est retardée.

Préparation des échantillons de sérum ou plasma : Ramener à température ambiante avant l'usage.

Contrôles Positifs et Négatifs : Ramener les réactifs à température ambiante avant l'usage.

Mode D'emploi

1. Ramener tous les réactifs à température ambiante (18-25°C) avant l'emploi.
2. Préparer le WASH BUFFER (voir Préparation du Tampon de Lavage).
3. Retirer le nombre requis de micropuits MPMW. Immédiatement refermer le sac contenant les micropuits restants avec du ruban adhésif.
4. Ajouter 100µL de SAMPLE, de contrôle positif (CONTROL +) ou échantillon patient positif) et de contrôle négatif (MPCD ou CONTROL -) dans chaque micropuits. Inclure deux contrôles positifs et deux contrôles négatifs dans chaque série de dosage. Couvrir et incuber une (1) heure à 37°C en chambre humide.
5. Dans les 10 dernières minutes de l'incubation, préparer la solution de travail de CONJUGATE. Ajouter 5µL de conjugué concentré MAPO à 995µL de diluant de conjugue MACD et mélanger vigoureusement (prévoir 1 mL de solution de travail par barrette de 8 micropuits).
6. Laver les micropuits au laveur automatique ou manuellement comme suit :

   - Vider le contenu des micropuits. Remplir les micropuits de WASH BUFFER.

   - Répéter l'opération quatre (4) fois. Apres le cinquième lavage, rabattre vigoureusement la plaque de micropuits inversée sur une serviette absorbante jusqu'à ce qu'aucun liquide n'en sorte.

- NB : opérez cette étape avec précaution, en serrant le cadre de la plaque à micropuits pour éviter qu'ils ne s'en délogent.

7. Ajouter 100 pi de conjugué dilué dans chaque puits. Incuber une (1) heure à 37°C en chambre humide.

8. Dans les 10 dernières minutes de l'incubation, préparer la solution de travail de SUBSTRATE. Ajouter 50µL de substrat chromogène MPSC à 950µL de tampon de substrat MPSB et mélanger vigoureusement (prévoir 1mL de solution de travail par barrette de 8 micropuits). Cette solution de travail est stable pendant 30 minutes.

9. Répéter le lavage comme à l'étape 6.

10. Ajouter 100µL de SUBSTRATE frais et incuber (couvert) à l'obscurité pendant 15 minutes à température ambiante.

11. Ajouter 50µL de solution d'arrêt MPSS. Taper la plaque pour mélanger.

12. Lire les résultats visuellement ou au spectrophotomètre à 450 nm ou à 450nm/620 nm, calibré à l'air.

LECTURE DES RESULTATS

Lecture visuelle

Observer l'intensité couleur des échantillons et des contrôles. Les contrôles positifs doivent être bleu avant l'étape d'arrêt et jaune après.

Lecture spectrophotométrique

Lire les résultats dans un spectrophotomètre à microplaque ELISA calibré à l'air à 450 nm ou 450 nm/620 nm. Pour être valides, les valeurs de contrôles négatifs doivent être comme suit :

	OD Value (450nm, 450/620nm)
Contrôle Négatif	< 0.20
Contrôle Positif	> 0.1.5

Les échantillons de sang négatifs doivent donner une densité optique inférieure à 0.2 unités de D.O. Néanmoins, afin de compenser pour les variations inter laboratoires, nous recommandons à chaque laboratoire d'inclure un certain nombre d'échantillons négatifs confirmés afin d'étalonner le seuil discriminant entre positif et négatif.

DECHETS

Jetez tout composant inutilisé dans la poubelle aux déchets biologiques. Consultez la fiche de sécurité du produit (notice MSDS) pour plus amples informations.

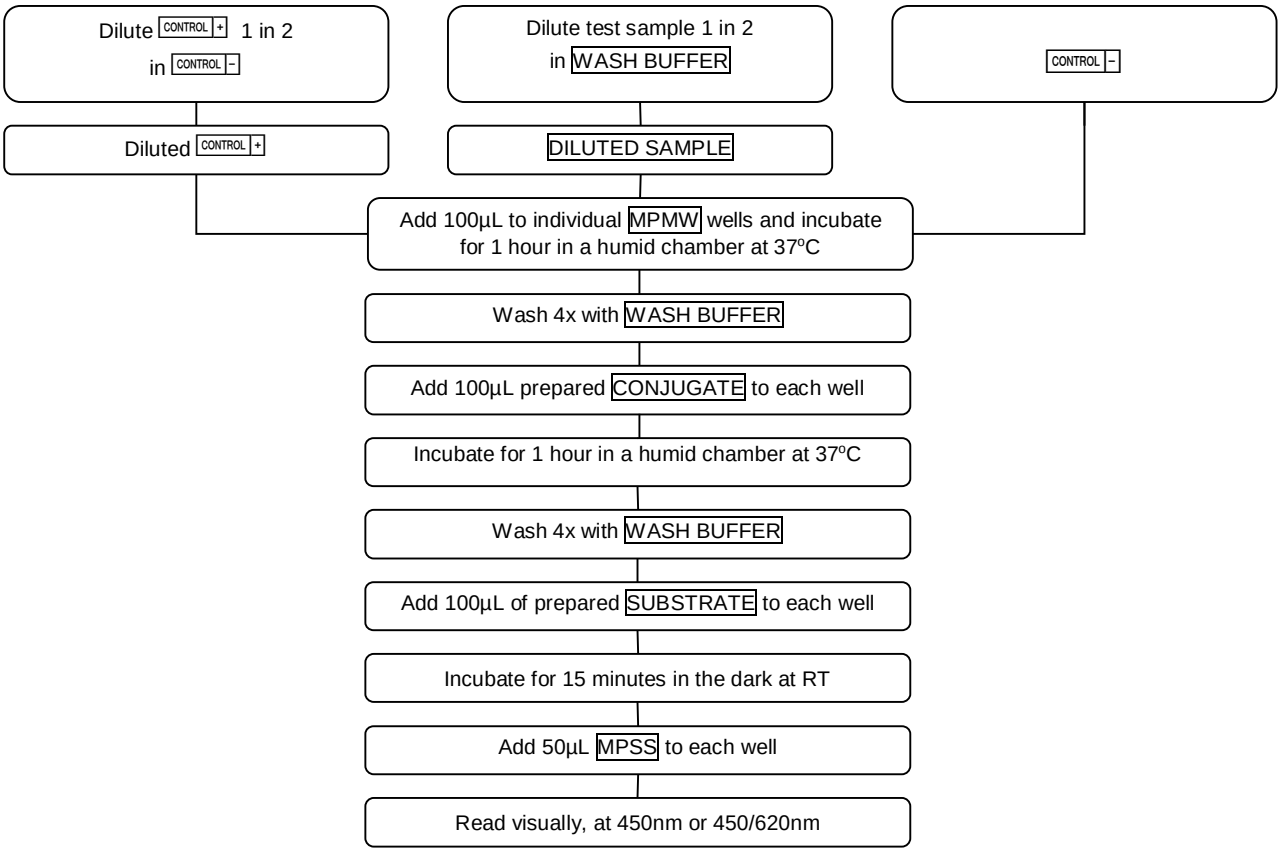
SENSIBILITE, SPECIFICITE ET AUTRES DONNEES DU TEST

Contactez Cellabs ou votre distributeur pour l'obtenir.

NOTICE D'INDEMNITE

Toute modification ou variation du protocole d'emploi recommandé peut affecter les performances annoncées du produit. Un résultat positif ou négatif n'exclue pas la présence d'autres agents causatifs sous-jacents. Cellabs et ses agents et distributeurs ne sont légalement responsables d'aucun dommage dans de telles circonstances.

FIGURE 1 Quantimal™ pLDH Malaria CELISA


Dilute CONTROL + 1 in 2 in CONTROL -
Dilute test sample 1 in 2 in WASH BUFFER
CONTROL -
Diluted CONTROL +
DILUTED SAMPLE
Add 100µL to individual MPMW wells and incubate for 1 hour in a humid chamber at 37°C
Wash 4x with WASH BUFFER
Add 100µL prepared CONJUGATE to each well
Incubate for 1 hour in a humid chamber at 37°C
Wash 4x with WASH BUFFER
Add 100µL of prepared SUBSTRATE to each well
Incubate for 15 minutes in the dark at RT
Add 50µL MPSS to each well
Read visually, at 450nm or 450/620nm

EXPLANATION OF SYMBOLS

	Consult Instructions for Use
IVD	*In Vitro* Diagnostic Medical Device
2°C 8°C	Temperature Limitation
LOT	Batch
CONTROL +	Control Positive
CONTROL -	Control Negative
	Use By/Expiration Date
	Do Not Re-use

Cellabs Pty Ltd
Unit 7, 27 Dale Street (PO Box 421)
Brookvale, NSW 2100 Australia
Tel: +61 2 9905 0133 Fax: +61 2 9905 6426
Web: http://www.cellabs.com.au
Email: sales@cellabs.com.au

EC REP WMDE
Bergerweg 18
6085 AT Horn
The Netherlands

Insert Version: en fr LM7.6 11 November 2013